ÁREA TEMÁTICA: SAÚDE

Comparação da citogenética com FISH em pacientes com leucemias e síndrome mielodisplásica

Dayane Molin[1]
Dayane Molin[2]
Nalini Drieli Josviak [3]
Everson Augusto Krum[4]
Marcelo Ricardo Vicari

RESUMO – As leucemias caracterizam-se por desequilíbrio entre a divisão, diferenciação e morte dos precursores hematopoéticos como conseqüência de modificações na estrutura ou nas funções dos genes. As síndromes mielodisplásicas (MDS) formam um grupo de doenças caracterizadas por uma medula óssea hiper ou normocelular e citopenias periféricas. A citogenética, no diagnóstico de leucemias, é considerada um marcador prognóstico bem definido sendo desejável que todos os serviços de onco-hematologia pudessem realizá-lo. Uma técnica molecular derivada da citogenética, a hibridação in situ por fluorescência – FISH- identifica o rearranjo cromossômico ou alguma alteração no locus gênico sob estudo, permitindo a detecção de anormalidades cromossômicas específicas em interfases ou metáfases. Com estes dados da constituição cromossômica o médico pode definir melhor o prognóstico e ainda propor um esquema terapêutico mais apropriado conforme a anormalidade citogenética. Apesar da FISH estar na vanguarda tecnológica, não é ofertado rotineiramente na maioria das regiões do Estado do Paraná e mesmo do Brasil. Desta forma a UEPG, com este projeto, se insere na comunidade transferindo o conhecimento e a técnica de última geração, propiciando que pacientes portadores destas neoplasias possam usufruir de forma gratuita, de um exame de última geração e de grande importância clínica. O trabalho tem como um dos objetivos oferecer, gratuitamente, exame de última geração, a FISH, permitindo que os onco-hematologistas possuam mais uma ferramenta diagnóstica para auxílio no tratamento. Foram utilizadas amostras de medula óssea de pacientes portadores de leucemias, atendidos no Instituto Sul Paranaense de Oncologia (ISPON). Até o momento a citogenética clássica foi realizada com seis amostras, sendo duas crônicas, duas agudas e duas sem metáfases analisáveis. As técnicas de cultura e preparação citológica empregadas foram satisfatórias na obtenção de cromosssomos metafásicos, cariótipo e bandamento cromossômico (GTG). A FISH foi realizada conforme instruções do fabricante, confirmando o diagnóstico de leucemia mielóide crônica em duas amostras.

PALAVRAS CHAVE – bandamento G, cariótipo, técnica molecular.

Introdução

As leucemias constituem um grupo de doenças hematológicas de grande importância na clínica médica, de curso, muitas vezes, rapidamente fatal dependendo principalmente da idade do paciente e da constituição cromossômica, caracterizando-se por desequilíbrio entre a divisão, diferenciação e morte dos precursores hematopoéticos como conseqüência de modificações na estrutura ou nas funções dos genes.

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença maligna da medula óssea, onde mieloblastos expandem-se, acumulam-se e suprimem a atividade hematopoética normal (GEER *et al,* 1999). É uma neoplasia hematológica heterogênea constituindo um enorme desafio diagnóstico e terapêutico. Apesar de todos os progressos no campo da onco-hematologia e da obtenção de índices de remissão pós-indução atingindo os 80%, a taxa de cura em LMA permanece em torno de 20% (APPELBAUM *et al,* 1998).

[1] Graduanda, estudante, dayanem_2@hotmail.com
[2] Graduanda, estudante, dayanem_2@hotmail.com
[3] Graduanda, estudante, drinaly@hotmail.com
[4] Doutor em hematologia, professor adjunto na UEPG, everson.krum@uol.com.br
Doutor, docente, vicarimr@yahoo.com.br

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é caracterizada pela proliferação de células mielóides maduras diferenciadas. Apresenta um pico de incidência entre 45 e 55 anos de idade, podendo acometer crianças e, em 10% a 15% dos casos, pacientes a partir de 60 anos (SAWYERS, 1999). A LMC é desencadeada, na sua grande maioria, a partir de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 t(9;22), denominado cromossomo Philadelphia (Ph1) (KEATING, 2001).

A síndrome mielodisplásica (MDS) é um grupo heterogêneo de desordens clonais caracterizada por uma medula óssea hiper ou normocelular e citopenias periféricas (ROMEU *et al,* 2002).

Anomalias cromossômicas clonais são observadas em 30-50% dos pacientes com MDS primária. Anomalias numéricas são as mais freqüentes e cromossomos 5, 7 e 8 estão envolvidos em mais de 50% dos casos anormais (FENAUX *et al*, 1996; BERNELL *et al*, 1996).

A avaliação citogenética da MDS tem sido considerada importante não apenas para determinação de clonalidade no momento diagnóstico, mas também para o prognóstico (ANASTASI *et al*, 1993).

Apesar da sua importância, por vezes, cariótipos por banda-G não podem ser realizados em pacientes com MDS devido a dificuldades técnicas, tais como o baixo índice mitótico. Além disso, cariótipo é um processo moroso e anomalias cromossômicas clonais ocorrendo em uma minoria de células pode ser ignorada (LUKE *et al*, 1997).

Não há dúvidas quanto ao fato de a citogenética, no diagnóstico da LMA, ser considerada um marcador prognóstico bem definido (MRÓZEK *et al*, 1997). Certas alterações citogenéticas encontradas em determinados subtipos de leucemias podem indicar o tratamento mais adequado.

A ratificação da importância da citogenética em LMA veio com o trabalho patrocinado pela Organização Mundial da Saúde, e que resultou na classificação da OMS para hemopatias malignas (JAFFE *et al*, 2001), que considera a alteração cromossômica e/ou molecular de grande importância no tratamento e prognóstico dos pacientes com leucemia. Atualmente com os resultados de cariótipo é possível estratificar os pacientes com LMA, predizer doentes com maior ou menor possibilidade de atingir êxito terapêutico e acompanhar os doentes para detecção de recaída ou doença residual mínima (ROWLEY, 2000).

Quando a citogenética clássica é insuficiente na caracterização de alterações, ou quando o resultado do cariótipo é normal, a utilização de técnicas de citogenética molecular como *FISH,* são complementares e contribuem para desvendar anormalidades da constituição cromossômica.

A hibridação *in situ* por fluorescência – *FISH*- é baseada na habilidade de uma fita simples de DNA se anelar com um DNA complementar. Identifica, pelo uso de sondas fluoresceínadas, o rearranjo cromossômico ou alguma alteração no *locus* gênico sob estudo. Permite um rápido exame de um grande número de células e a detecção de anormalidades cromossômicas específicas em intérfases e metáfases.

A grande vantagem da *FISH* é que mesmo em material em que não se obtém mitoses ou em material inadequado para a análise citogenética é possível a detecção das anormalidades (RIBEIRO JÚNIOR, 2004).

A desvantagem de *FISH* é que só há possibilidade de encontrar a alteração que especificamente está sendo procurada, o que significa que outras anormalidades podem passar despercebidas.

Conhecer a fundo o funcionamento destes mecanismos defeituosos é o grande desafio da ciência moderna, com a citogenética e técnicas moleculares, como FISH, ocupando papéis fundamentais na identificação das alterações cromossômicas e contribuindo sobremaneira para desvendar a patogênese das leucemias e da MDS.

Com estes dados da constituição cromossômica o médico pode definir melhor o prognóstico e ainda propor um esquema terapêutico mais apropriado conforme a anormalidade citogenética. Apesar da FISH estar na vanguarda tecnológica, não é ofertado rotineiramente na maioria das regiões do Estado do Paraná e mesmo do Brasil. Desta forma a UEPG, com este projeto, se insere na comunidade transferindo o conhecimento e a técnica de última geração, propiciando que pacientes portadores destas neoplasias possam usufruir de forma gratuita, de um exame de última geração e de grande importância clínica.

Objetivos

O trabalho tem como objetivos oferecer, gratuitamente, exame de última geração, a FISH, permitindo que os onco-hematologistas possuam mais uma ferramenta diagnóstica para auxílio no

tratamento e utilizar os dados para análise e correlação com demais fatores envolvidos em leucemias.

Metodologia

Foram utilizadas amostras de medula óssea de pacientes portadores de leucemias, atendidos no Instituto Sul Paranaense de Oncologia (ISPON). Os pacientes ou representantes foram informados sobre o estudo e, voluntariamente, assinaram um termo de consentimento autorizando a utilização das suas células para pesquisa. O projeto recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UEPG, com protocolo 9/2007 número 199/2007.

Na análise citogenética, após aspiração da medula óssea com seringa heparinizada e de forma estéril, o material foi destinado à cultura de curta duração conforme a técnica adotada no laboratório de citogenética da UEPG (CHAUFFAILE et al, 2001), descrito a seguir.

Duas amostras serão colocadas em frascos T de cultura contendo 7mL de RPMI, 3 mL de soro fetal bovino e 100 uL de L-glutamina, mantidos em estufa a 37ºC, durante 24 horas, quando então serão adicionados 50 uL de colchicina, a qual será deixada agir por 30 minutos. Após esta fase, será adicionada solução hipotônica de KCl a 0,075 mol/L e o material fixado com solução 3:1 de ácido acético e metanol e lavado por 3 vezes (CHAUFFAILE et al, 2001).

As lâminas foram coradas pela banda G, tripsina-Giemsa (GTG). As metáfases foram analisadas em microscópio (Olympus BX) acoplado a sistema computadorizado de análise de imagem Cytovision (Applied Biosystem). As descrições de cariótipo foram feitas conforme a ISCN 1995 (MITELMAN, 1995).

O procedimento de Hibridação in situ fluorescente foi realizado com a utilização das sondas BCR/ABL em pacientes suspeitos de portar translocação dos cromossomos 9 e 22 de acordo com as recomendações do fabricante (Poseidon).

Resultados

Na análise de citogenética clássica, foram analisadas seis amostras de pacientes, três homens e três mulheres, com idade variando de 32-88 anos; portadores de leucemias mielóides (4 LMA, 2 LMC).

As metáfases observadas, não apresentaram alterações numéricas de cromossomos e as alterações cromossômicas puderam ser detectadas a partir da montagem dos cariótipos. Os dois pacientes portadores de leucemia mielóide crônica apresentaram o cromossomo Philadelphia, t(9,22) e dois pacientes portadores de leucemia mielóide aguda apresentaram cariótipo normal.

Até o momento a técnica de FISH foi realizada com quatro amostras de leucemia mielóide crônica, confirmando o diagnóstico já encontrado na análise citogenética clássica em duas delas. . A análise da FISH com as sondas BCR/ABL mostrou núcleos interfásicos com a presença de um sítio do cromossomo 9 (em vermelho), um sítio do cromossomo 22 (em verde) e um sítio de sobreposição vermelho e verde como resultado da translocação 9/22. Nas outras duas não obtiveram-se resultados devido, provavelmente, a erros laboratoriais ou a inexistência de metáfases nas amostras utilizadas.

Conclusões

As técnicas de cultura e preparação citológica empregadas foram satisfatórias na obtenção de cromosssomos metafásicos, pois foi obtido um bom índice de células mitóticas. Um bom percentual de aproveitamento das amostras (66,7%) foi detectado, em consonância com o obtido em outros laboratórios mais especializados. As bandas cromossômicas ficaram evidentes, permitindo o pareamento, montagem de cariótipos e detecção das alterações cromossômicas. A técnica de FISH, embora parcialmente amostrada neste estudo, têm demonstrado ser um procedimento altamente eficiente no diagnóstico das leucemias. Na continuidade deste estudo, um número maior de pacientes suspeitos de translocação 9/22 serão analisados por FISH, além da ampliação da utilização deste método com a utilização de sondas cromossômicas em pacientes portadores de outras translocações. Desse modo, o laboratório de citogenética da Universidade Estadual de Ponta Grossa poderá realizar gratuitamente, em breve, esses exames para pacientes atendidos na região dos Campos Gerais.

Referencias

ANASTASI, J.; FENG, J.; LE BEAU, M.M.; LARSON, R.A.; ROWLEY, J.D.; VARDIMAN, J.W., Citogenetic clonality in myelodisplastic syndrome studied with fluorescence in situ hybridization: lineage, response to growth factor therapy, and clone expansion. Blood 81 6 (1993), pp.1580-1585.

APPELBAUM, F.R.; GILLILAND, G.; TALLMAN, M.S. The Biology and Treatment of Acute Myeloid Leukemia. American Society of Hematology- Education Program Book: 1998, p. 15-43.

BERNELL, P.; JACOBSON, A.; NORDGREN, A.; HAST, R., Clonal cell lineage involvement in myelodysplasic syndrome studied by fluorescence in situ hybridization and morphology. Leukemia 10 (1996), pp. 662-668.

CHAUFFAILE M.L., FIGUEIREDO M.S., BELTRANI R., ANTUNES S.V., YAMAMOTO M., KERBAUY J. Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetic techniques. Braz J Med Biol Res 2001 Jun;34(6):735-43.

FENAUX, P.; MOREL, P.; LAI, J.L., Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. Semin. Haemotol. 33 2 (1996), pp. 127-138.

GEER, J.P.; BAER,M.R.; KINNEY, M.C. Acute Myelogenous Leukemia IN: Lee RG, Foerster J.L., Paraskevas F., Geer J.P., Rodgers G.M. Wintrobe's Clinical Hematology Philadelphia, Williams & Wilkins 1999, 10 ed. Cap 88:2.272-2.319.

JAFFE E.S., HARRIS N.L., STEIN H., VARDIMAN J.W. (2001). World Health Organization Classifications of Tumours. Pathology and Genetics of Tumour of Haematopoietic Tissues. IARC Press, Lyon, France.

KEATING, M.J. As leucemias crônicas. In: Goldman L, Bennett JC. Tratado de Medicina Interna, 21º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2001;1.049-59.

LUKE, S.; VARKEY, V.; BELOGOLOVKIN, V.; LADOULIS, C.T., Current state os fluorescence in situ hybridization (FISH) in diagnostic pathology. Cell Vision 4 7 (1997), pp. 16-31.

MITELMAN F. (1995). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Karger, Basel, Switzerland.

MRÓZEK, K. et al. Clinical significance of cytogenetics on acute myeloid leukemia. Semin Oncol 1997; 24:17-31.

RIBEIRO JÚNIOR, A. Estudo das alterações cromossômicas por citogenética clássica e molecular em mieloma múltiplo. Dissertação. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2004.

ROWLEY, J.D. Molecular genetics in acute leukemia. Leukemia. 2000 Mar;14(3):513-517.

SAWYERS, C.L. Chronic myeloid leukemia. **N Eng J Med** 1999; 340 (17):1.330-40.
ROMEU, M.; CHAUFFAILLE, M.L.; SILVA, M.R.R.; BAHIA, D.M.M.; KERBAUY, J. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. Leukemia Research, São Paulo, v.26, n.11, p.993-996, nov. 2002.